



Anti-HBs Elisa

KAPG4SBE3



Anti-HBs Elisa

en

For in vitro qualitative detection of Antibody to Hepatitis B surface antigen
(Anti-HBs) in human serum or plasma.

KAPG4SBE3

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) INTENDED USE

Anti-HBs Elisa is an enzyme immunoassay diagnostic kit for in vitro qualitative detection of Antibody to Hepatitis B surface antigen (Anti-HBs) in human serum or plasma (heparin, citrate or EDTA).

The test can be used prior and after hepatitis B vaccination to assess the immune status as well as an aid to diagnose and monitor infections by hepatitis B virus.

2) SUMMARY AND TEST EXPLANATION

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) is the first antigen to appear following infection by hepatitis B virus. The development of antibodies against HBsAg (anti-HBs) occurs in 90% of patients infected with HBV late in convalescence approx. 3 to 4 months after the onset of the disease and is associated with resolution of the infection and protective immunity. The absence of anti-HBs is indicative of susceptibility to HBV infection, and can identify individuals who may benefit from vaccination. WHO reports that people with an anti-HBs titer of 10 mIU/mL can be assumed to be protected against HBV infection. The measurement of anti-HBs is useful for pre-immunization screening as well as to establish seroconversion after an infection or following active immunization with hepatitis B vaccines. Anti-HBs titers of < 100 mIU/mL will identify inadequate responders who require booster vaccination within one year. In addition, anti-HBs testing is useful to monitor the course of disease following acute HBV infection.

Anti-HBs Elisa is a fast test for the qualitative detection of the presence of antibodies to HBsAg in serum or plasma (heparin, citrate or EDTA) specimens. The test utilizes HBsAg on the wells and as peroxidase-conjugate.

Specimens which are non-reactive by Anti-HBs Elisa are considered negative for Anti-HBs. Specimens with positive reaction should be retested in duplicate.

The test has to be repeated in duplicate for specimens with absorbance value within the Retest Range (Cutoff Value $\pm$ 10 %).

3) TEST DESCRIPTION

Anti-HBs Elisa is a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA= enzyme-linked immuno-sorbent assay) based on the "sandwich principle". The solid phase of the microtiter plate is made of polystyrene wells coated with HBsAg (subtype Ad and Ay), and the liquid phase of peroxidase conjugated HBsAg (subtype Ad and Ay).

When a serum or plasma specimen containing Anti-HBs is added to the HBsAg-coated wells together with the peroxidase conjugated HBsAg and incubated, (antigen)-(Anti-HBs)-(antigen • peroxidase) complexes will form on the wells. After washing the microtiter plate to remove unbound material, a solution of TMB substrate is added to the wells and incubated. A color develops in proportion to the amount of Anti-HBs bound to HBsAg. The peroxidase-TMB reaction is stopped by addition of sulfuric acid. The optical density of developed color is read with a suitable photometer at 450 nm with a selected reference wavelength within 620 to 690 nm⁻¹.

The above test principle is shown also in the following figure.

A Specimen containing Anti-HBs:

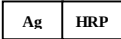
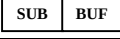
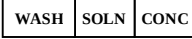
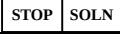
1. Plate well (HBsAg) + specimen (Anti-HBs) + HBsAg • peroxidase
→ HBsAg • Anti-HBs • (HBsAg • peroxidase) sandwich complex
2. Sandwich complex + TMB substrate solution
→ Light blue to blue color
3. Add sulfuric acid to stop the color development
→ Read OD at 450 nm/620-690 nm⁻¹

B Specimen without Anti-HBs:

1. Plate well (HBsAg) + specimen (no Anti-HBs) + HBsAg • peroxidase
→ HBsAg (on the well)
2. HBsAg (on the well) + TMB substrate solution
→ Colorless to light blue color
3. Add sulfuric acid to stop the color development
→ Read OD at 450 nm/620-690 nm⁻¹

4) DESCRIPTION OF PROVIDED MATERIALS

- Item 1 - 6 on the following reagent table should be refrigerated at +2 to +8°C . Washing Solution (20x) and stop solution can be stored at +2 to +30°C.

ITEMS	Components	Description	Qt. per 96 tests
(1)	HBsAg Plate 	Microtiter plate coated with HBsAg.	1 plate
(2)	HBsAg Peroxidase Solution 	HBsAg HRPO conjugate, diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 8 ml
(3)	Anti-HBs Positive Control 	Inactivated human Anti-HBs positive serum diluted in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 1.5 ml
(4)	HB Negative Control 	Serum non-reactive for HBV markers in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% Gentamycin and 0.01% Thimerosal.	1 bottle, 2 ml
(5)	Chromogenic TMB concentrate 	0.6 mg/ml of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base.	1 bottle, 12 ml
(6)	Substrate buffer 	Citrate Acid Buffer containing 0.03% H ₂ O ₂ .	1 bottle, 12 ml
(7)	Conc. Washing Solution (20x) 	Concentrated Phosphate buffer with Tween-20	1 bottle 58 ml
(8)	Stop Solution 	1N H ₂ SO ₄ (Sulfuric Acid)	1 bottle 12 ml

• OTHER MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

ITEMS	Components
(1)	50 µl, 100 µl micropipettes and tips are needed.
(2)	Waterbath or incubator with temperature control at +37°.
(3)	Plate washing equipment.
(4)	ELISA microwell reader: Dual wavelength 450nm with 620-690nm as reference wavelength, bandwidth 10nm ⁻¹ .
(5)	Fully automatic EIA micro-plate analyzer is optional. User should validate the automatic EIA micro-plate analyzer in combination with the kit.

4.1) Storage Condition and Stability of the kit *

Kit/components	Storage condition	State	Stability
Anti-HBs Elisa KIT	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HBs Positive Control	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
HB Negative Control	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
HBsAg Plate	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	2 month
HBsAg HRPO Conjugate Solution	+2 to +8°C	Original	15 months
		Once open	1 month
Concentrated Washing Solution (20X)	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month
20X Diluted Washing Solution	Room temp.	Diluted	2 days
	+2 to +8°C	Diluted	1 week

Chromogenic TMB concentrate	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
Substrate buffer	+2 to +8°C	Original	24 months
		Once open	1 month
2N Sulfuric Acid	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month

5) INSTRUCTIONS FOR USE

5.1) Warning:

- 5.1.1) This reagent kit is for professional use only.
- 5.1.2) This reagent kit is for *in vitro* diagnostic use only.
- 5.1.3) Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30°) and mix carefully before use.
- 5.1.4) Do not use reagent beyond its expiration date.
- 5.1.5) Do not interchange reagents between different lots.
- 5.1.6) Do not put the pipette in your mouth.
- 5.1.7) Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
- 5.1.8) The positive control, negative control, conjugate solution and specimens should be regarded as potential health hazards. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures may include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.
- 5.1.9) Potential infectious specimens and nonacid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with the local procedures for potential bio-hazard control.
- 5.1.10) Prior to disposing used specimens and kit reagents as general waste, it should be treated in accordance with the local procedures for potential bio-hazardous waste or treated as follows:
Both liquid and solid waste should be autoclaved maintaining +121°C for at least 30 minutes.
Solid waste can also be incinerated.
Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.
Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.
- 5.1.11) Stop solution is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the stop solution with skin and mucous membranes. In case of contact, clean with large lots of water immediately. In case of inhalation, supply fresh air and seek medical advice in case of complaints.
- 5.1.12) Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent which is toxic: danger of serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed.
Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.
- 5.1.13) Although all material of human source is tested nonreactive for Anti-HCV and Anti-HIV, and inactivated at +56°C for one hour, the reagent shall be handled as potential infectious material.²

5.2) Specimen Collection and Preparation for Analysis

- 5.2.1) No special preparation of the patient is required prior to blood collection. Blood should be collected by approved medical techniques.
- 5.2.2) Either serum or plasma specimens can be used with this test kit. Whole blood specimen should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Any particulates (e.g. fibrin clots, erythrocytes) contained in the specimen should be removed prior to use.
- 5.2.3) Specimens must be stored at +2 to +8°C and avoid heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, specimens should be frozen below -20°C. Storage in self-defrosting freezer is not recommended.
- 5.2.4) Frozen specimens must be thoroughly thawed and mixed homogeneously before testing.
- 5.2.5) Avoid multiple freeze-thaw procedures

5.2.6) WARNING

1. The specimen must not contain any AZIDE compounds, which can inhibit the peroxidase activity of the conjugate.
2. Incompletely coagulated serum samples and microbial-contaminated specimens should not be used.

5.3) Reagents Storage

- 5.3.1) The kit must be stored at +2 to +8°C. Do not freeze.
- 5.3.2) Strips of the plate should be used within 2 months after opening the original aluminum foil bag. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped tightly.
- 5.3.3) Return reagents to +2 to +8°C immediately after use.
- 5.3.4) Washing Solution (20x) Concentrate can be stored at room temperature to avoid crystallization, because the kits are stored and shipped at +2 to +8°C. If crystals have been precipitated before use, warm up the solution in +37°C water bath till the crystals dissolve.

5.4) Plate Washing Procedure

5.4.1) Preparation of washing solution:

Dilute Washing Solution (20x) Concentrate with distilled or de-ionized water to 1:20 dilution. Do not use tap water.

5.4.2) Plate washing:

(a) For plate washer with overflow aspirating function: 6 cycles with at least 0.5ml washing buffer per well per cycle.

Or

(b) For plate washer without overflow aspirating function: 8 cycles with at least 0.35 ml washing buffer per well per cycle."

5.4.3) Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer in the wells will cause false results.

WARNING

Improper washing will cause false results.

5.5) Test procedure

5.5.1) Bring all reagents and specimens to room temperature (+20 to +30°C) before assay. Adjust water bath or incubator to +37±1°C.

5.5.2) Reserve one well for blank. Add 50µl of each control or specimen to appropriate wells of reaction plate (3 Negative Controls and 2 Positive Controls).



NOTE:

- a) Use a clean pipette tip for each sampling to avoid cross-contamination
- b) Each plate needs its own negative controls, positive controls and blank well.
- c) Do not use any cut-off value established for other plates of Anti-HBS Elisa.

5.5.3) Add 50 µl of HBsAg • Peroxidase solution to each well except the blank.



NOTE:

Do not touch the well wall for preventing contamination.

5.5.4) Gently tap the plate.

5.5.5) Remove the protective backing from the adhesive Slip and press it onto the reaction plate, so that it is tightly sealed.

5.5.6) Incubate the reaction plate in a +37±1°C water bath or incubator for 1 hour.

5.5.7) At the end of the incubation period, remove and discard the Adhesive Slip and wash the plate in accordance with 5.4) Plate washing procedure.

5.5.8) Select one of the following two methods for color development:

- A. Mix equal volumes of Chromogenic TMB concentrate **and Substrate buffer** in a clean container immediately prior to use. Add **100 µl** of the mixture solution to each well including the blank well.
- B. Add **50 µl** of Chromogenic TMB concentrate first, and then add **50 µl** of Substrate buffer into each well including the blank. Carefully mix well.



NOTE:

Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue; otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer should be used within 30 minutes after mix. The mixture should be avoided from intense light.

5.5.9) Cover the plate with a black cover and incubate at room temperature for 30 minutes.

5.5.10) Stop the reaction by adding 100µl of stop solution to each well including the blank.

5.5.11) Determine the absorbance of Controls and test specimens within 30 minutes with a precision photometer at 450 / 620-690 nm (450 nm reading wavelength with 620-690 nm reference wavelength)⁷. Use the blank well to blank photometer.



NOTE: The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test results are invalid.
Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100.

5.6) Calculation of Test Results

5.6.1) Calculation of the NCx (Mean Absorbance of Negative Control).

Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.015
2	0.016
3	0.014

$$NCx = (0.015 + 0.016 + 0.014) / 3 = 0.015$$

NCx must be ≤ 0.2 , otherwise, the test is invalid.

5.6.2) Calculation of the PCx (Mean Absorbance of Positive Control)

Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.846
2	0.902

$$PCx = (0.846 + 0.902) / 2 = 0.874$$

PCx must be ≥ 0.5 , otherwise, the test is invalid.

5.6.3) Calculation of the P - N Value

$$P - N = PCx - NCx$$

Example: $NCx = 0.015$

$PCx = 0.874$

$$P - N = 0.874 - 0.015 = 0.859$$

P - N Value must be ≥ 0.3 , otherwise, the test is invalid.

5.6.4) Calculation of the Cutoff Value

$$\text{Cutoff Value} = NCx + 0.025$$

Example: $\text{Cutoff Value} = 0.015 + 0.025 = 0.040$

5.6.5) Calculation of the Retest Range

$$\text{Retest Range} = \text{Cutoff Value} \pm 10\%$$

Example: $\text{Cutoff Value} = 0.040$

$$\text{Retest Range} = (0.040 - 0.004) \text{ to } (0.040 + 0.004) = 0.036 \text{ to } 0.044$$

5.7) Validity of the Test Runs

5.7.1) **NCx should be ≤ 0.2 ; otherwise, the test is invalid.**

5.7.2) **PCx should be ≥ 0.5 , otherwise, the test is invalid.**

5.7.3) **P - N Value must be ≥ 0.3 , otherwise, the test is invalid.**

NOTE: Negative Control: absorbance value must be less than or equal to 0.200 after subtracting the blank.

5.8) Interpretation of Results

5.8.1) Specimens with absorbance values less than $(0.9 \times \text{Cutoff Value})$ are considered NON-REACTIVE and are considered NEGATIVE for Anti-HBs.

5.8.2) Specimens with absorbance value greater than $(1.1 \times \text{Cutoff Value})$ are considered REACTIVE and are considered POSITIVE for Anti-HBs.

5.8.3) Specimens with absorbance value within the Retest Range ($\text{Cutoff Value} \pm 10\%$) shall be repeated in duplicate and interpreted as above.

Specimens with any of the repeat results in the retest range are reported as "indeterminate". It is suggested to test follow-up samples for "indeterminate" results.

5.9) Troubleshooting

If the result cannot be reproduced, perform a preliminary troubleshooting by checking the possibilities listed below:

5.9.1) Improper washing procedure.

5.9.2) Contamination with positive specimen.

5.9.3) Wrong volume of sample, conjugate or substrates.

5.9.4) Contamination of the well rim with conjugate.

5.9.5) Improper specimen such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing sediments and specimen not thoroughly mixed before use.

5.9.6) Wrong incubation time or temperature.

5.9.7) Obstructed or partial obstructed washer aspirate/dispense head and needles.

5.9.8) Insufficient aspiration.

5.10) Limitations and Interferences

- 5.10.1) This reagent kit is to be used for unpooled human serum or plasma only.
- 5.10.2) The reagent kit has not been validated for use with cadaveric samples.
- 5.10.3) Non-repeatable false positive results may be obtained with any enzyme immunoassay kit, largely due to technical error either from the part of the operator or malfunction of apparatus used.
- 5.10.4) Repeatable false reactive results ($\leq 2\%$) may occasionally be obtained.
- 5.10.5) An Anti-HBs negative result without other evidence does not preclude the possibility of previous infection with hepatitis B virus.
- 5.10.6) A (low) positive result in the anti-HBs ELISA is no proof of protection and such it should be not used to exclude an infection by hepatitis B virus.
- 5.10.7) Anti-HBs positive specimens may not always show linear serial dilution properties as in serial dilution of standard material.
- 5.10.8) Potential Interfering Substances:
The following results were obtained in respective experiments:
1. No interferences with different anticoagulants such as lithium heparin, K-EDTA, sodium citrate have been observed.
 2. Heat-treated specimens (+60°C, 10 hours) exhibited diminished HBsAg titer.
 3. No cross reactivity was detected using specimens deriving from patients a) with other infections by HAV, EBV, CMV, HSV, VZV, Lyme Borreliosis, HCV, HIV, b) with other disease states such as chronic renal failure, hemodialysis, autoimmune hepatitis, liver cirrhosis, and c) presenting certain antibodies like HAMA, GAD, IA2, APS).
 4. Samples containing potential interfering substances [e.g. triglycerides (lipemia), hemoglobin (hemolysis), bilirubin (icterus), monoclonal immunoglobulin components, elevated levels of autoimmune antibodies (rheumatoid factor-RF, antinuclear antibodies-ANA, or antimitochondrial antibodies-AMA)] and samples from pregnant women did not interfere with the Anti-HBs Elisa assay.

5.11) Performance characteristics

5.11.1) Diagnostic Specificity

Results from the European Performance Evaluation for DAsource Anti-HBs Elisa - Reactivity of HBV Negative "Donor" and "Clinical" Specimens.

Anti-HBs negative Sample	No. of sample	Negative
Unselected donor samples	400	400
Hospitalized patients	134	134
Potential interfering samples	50	49
Total	584	583

Diagnostic specificity = $583/584 = 99.83\%$

5.11.2) Analytical Sensitivity:

Detection limit determined using dilutions of Anti-HBs Standards

The analytical sensitivity was determined to be 3.6 mIU/ml of anti-HBs for the DAsource Anti-HBs Elisa assay using among others the PEI Anti-HBs Standard.

The S/CO for 10 mIU/ml of anti-HBs was about 1.60. For routine testing, it may be useful and practical to increase the cutoff value for the positive result to 1.6x standard/CO in order to achieve a cutoff of approximately 10 mIU/ml of Anti-HBs ("protective titer").

5.11.3) Test Linearity using blood samples

Linearity was evaluated using two high-titer Anti-HBs-positive serum samples by diluting them throughout the measuring range of the assay and then around the cutoff level in narrow dilution steps.

The DAsource Anti-HBs Elisa assay showed linear behavior on dilution between 3.6 and 240 mIU/ml.

5.11.4) Diagnostic Sensitivity

Positive specimens/Specimens used to evaluate the sensitivity/ Patients with HBV infection

5.11.4.1) HBV infected individuals

Anti-HBs positive samples	No. of samples	Positive results
Natural infected individuals	125	125
Hep B vaccinated individuals	111	111
Total	235	235

Diagnostic sensitivity = $235/235 = 100\%$

5.11.4.2) Commercial HBV seroconversion panels

4 commercially available HBV seroconversion panels consisting of follow-up samples which were collected at weekly or monthly intervals from patients suffering from acute hepatitis B, have been used. The ANTI-HBs ELISA assay was more sensitive than the Anti-HBs reference assay.

5.11.4.3) Follow-up samples

Samples were obtained from 22 healthy subjects who were vaccinated for hepatitis B. The testing was performed in samples from bleedings obtained before and 3 and 6 months after hepatitis B vaccination. A seroconversion for Anti-HBs was detected in all 22 subjects in the 3 months bleedings using the ANTI-HBs ELISA assay. On the other side, testing with the Anti-HBs reference assay showed seroconversion for 20 subjects in the 3 months after vaccination while for two further subjects the seroconversion was observed only in the samples obtained 6 months after vaccination. This indicates that the Anti-HBs Elisa is more sensitive than the Anti-HBs reference assay.

5.11.5) Evaluation of Precision

5.11.5.1) Accuracy: intra-run repeatability and inter-run reproducibility

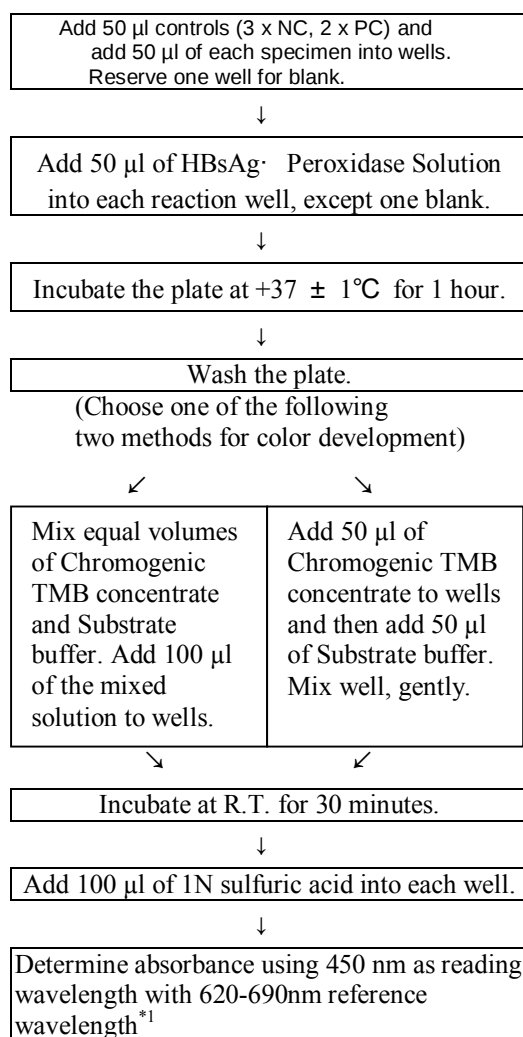
The positive control of the Anti-HBs Elisa assay (800 mIU/ml) and two serum samples with Anti-HBs levels just above cutoff and at medium level were tested in replicates of 20 in a single run over three days. The results were used to calculate the intra-run repeatability and inter-run reproducibility as presented in the following tables.

Item tested		Sample size	precision
Positive Control	intra-run	N = 20	CV 10.27%
	inter-run	N = 60	CV 7.11%
Patient Serum #1	intra-run	N = 20	CV 7.57%
	inter-run	N = 60	CV 7.17%
Patient Serum #2	intra-run	N = 20	CV 9.05%
	inter-run	N = 60	CV 7.71%

5.11.6) Traceability

DIAsource anti-HBs Master Calibrator has been calibrated against the WHO Anti-HBs-IgG Standard (W1042) using the anti-HBs ELISA assay. The relative potency of the WHO Anti-HBs Standard versus the DIAsource anti-HBs Master Calibrator is 1.205 (1.117-1.297 95% CI). The Anti-HBs concentration of the Positive Control of anti-HBs ELISA assay has been determined against the DIAsource anti-HBs Master Calibrator and was established with 800 mIU/ml $\pm$ 20%.

5.12) Flow Chart of the Test Procedure



6) NOTES

*1 The reference wavelength of the photometer to be used can be 620 nm to 690 nm. However, the user should validate the photometer in combination with Anti-HBs Elisa before use.

*2 Incomplete inactivation of hepatitis B virus after heat treatment at +60°C for 10 hours, J. Infect. Dis. 138:242-244.

7) BIBLIOGRAPHY

1. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Sem Liver Disease. 1991;11:73–83.
2. Lander JJ, Holland PV, Alter HJ, Chanock RM, Purcell RH. Antibody to hepatitis-associated antigen. Frequency and pattern of response as detected by radioimmunoprecipitation. J Am Med Assoc. 1972;220:1079–1082.
3. Deinhardt F, Zuckerman AJ. Immunization against hepatitis B: Report on a WHO meeting on viral hepatitis in Europe; J Med Virology 1985;17:209 – 217.
4. Ambrosch F, Courouce AM, Coursaget P et al. International Group. Immunisation against hepatitis B. Lancet 1988;16: 875-876.
5. Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F. Persistence of specific antibodies after hepatitis B vaccination. Hepatol. 1988; 6:201-207.
6. European Consensus Group on Hepatitis B immunity: Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? Lancet. 2000;355:561–565.

Revision Date : 2011-06-27



Anti-HBs Elisa

es

Para la detección cualitativa in vitro del Anticuerpo contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B (Anti-HBs) en suero o plasma humano.

KAPG4SBE3

PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 –
Fax : +32 10 84 99 90

1) USO PREVISTO

El kit de diagnóstico Elisa Anti-HBs es un inmunoensayo para la detección cualitativa in-vitro del Anticuerpo contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B (Anti-HBs) en suero o plasma humano (heparina, EDTA o citrato).

Este ensayo se puede realizar antes y después de la vacunación contra la hepatitis B tanto para evaluar el estado de inmunidad así como para ayudar en el diagnóstico y monitorizar infecciones por el virus de la hepatitis B.

2) RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es el primer antígeno que aparece después de la infección con el virus de la hepatitis B. El desarrollo de anticuerpos contra HBsAg (anti-HBs) ocurre en 90% de los pacientes infectados con el VHB tarde en la convalecencia, aproximadamente entre 3 y 4 meses después del inicio de la enfermedad y está asociado con la resolución de la infección e inmunidad protectora. La ausencia de anti-HBs indica que hay susceptibilidad a infección por VHB y puede identificar individuos que se podrían beneficiar con la vacuna. La OMS informa que se puede asumir que gente con un título de anti-HBs de 10 mIU/ml está protegida contra la infección por VHB. La medición de anti-HBs es útil para la investigación pre-inmunización como también para establecer seroconversión después de una infección o después de una inmunización activa con la vacuna de hepatitis B. Títulos anti-HBs < 100 mIU/mL identificarán a aquellos que responden mal y que requieren una vacuna de refuerzo dentro del año. Además, el análisis de anti-HBs es útil para controlar el curso de la enfermedad después de una infección aguda con VHB.

Anti-HBs Elisa es un ensayo rápido para la detección cualitativa de la presencia de anticuerpos IgM contra HBcAg en muestras de suero o plasma (heparina, EDTA o citrato). El ensayo utiliza HBsAg en los pocillos y conjugado con peroxidasa.

Las muestras que no resultan reactivas con Elisa Anti-HBs se consideran negativas para Anti-HBs. Las muestras con un resultado positivo deben ser repetidas en duplicado.

El ensayo debe ser repetido en duplicado en las muestras cuyo valor de absorbancia esté dentro del rango de repetición (Valor de Corte $\pm$ 10 %).

3) DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Anti-HBs Elisa es un inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA= *enzyme-linked immunosorbent assay*) – basado en "principio del sándwich". La fase sólida de la microplaca está formada por pocillos de poliestireno recubiertos con HBsAg (subtipo Ad y Ay), y la fase líquida del conjugado de con peroxidasa.HBsAg (subtipo Ad y Ay).

Cuando una muestra de suero o plasma que contiene Anti-HBs se agrega a los pocillos recubiertos con HBsAg junto con el HBsAg conjugado con la peroxidasa y se incuban, (antígeno)-(Anti-HBs)-(antígeno • peroxidasa) se formarán complejos en los pocillos. Después de lavar la microplaca para eliminar el material que no se ha unido, se agrega una solución de sustrato TMB a lo pocillos y se incuban. Se desarrolla color en proporción a la cantidad de Anti-HBs unido a HBsAg. La reacción peroxidasa-TMB se detiene agregando ácido sulfúrico. La densidad óptica del color que se ha generado se mide con un fotómetro adecuado a 450 nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690 nm^{*1}

El principio del ensayo descrito anteriormente se ilustra también en el siguiente diagrama.

A Muestra que contiene Anti-HBs:

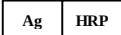
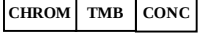
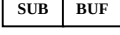
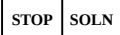
1. Placa (HBsAg) + muestra (Anti-HBs) + HBsAg • peroxidasa
→ HBsAg • Anti-HBs • (HBsAg • peroxidasa) complejo de sándwich
2. Complejo de sándwich + solución de sustrato TMB
→ color de azul a celeste
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color
→ Lea la DO a 450nm/620-690 nm^{*7}

B Muestra sin Anti-HBs:

1. Placa (HBsAg) + muestra (sin Anti-HBs) + HBsAg • peroxidasa
→ HBsAg (en los pocillos)
2. HBsAg (en los pocillos) + solución de sustrato TMB
→ Incoloro a azul claro
3. Agregue ácido sulfúrico para detener el desarrollo del color
→ Lea la DO a 450nm/620-690 nm^{*1}

4) DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS

● **Items 1 - 6 en la siguiente tabla de reactivos deben permanecer refrigerados entre + 2 y +8°C. La Solución de Lavado (20X) y la solución de parada pueden almacenarse entre +2 y +30°C.**

ITEM S	Componentes	Descripción	Cant. para 96 ensayos
(1)	HBsAg Placa 	Una microplaca recubiertos con HBsAg.	1 placa
(2)	Solución HBsAg • Peroxidasa 	HBsAg HRPO conjugado, diluido en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 8 ml
(3)	Control Positivo Anti-HBs 	Suero humano positivo para Anti-HBs inactivado diluido en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 1.5 ml
(4)	Control Negativo HB 	Suero no reactivo para los marcadores de VHB en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 2 ml
(5)	TMB Cromogénico concentrado 	0,6 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en una base orgánica	1 vial, 12 ml
(6)	Tampón del Sustrato 	Tampón de ácido cítrico con 0,03% H ₂ O ₂ .	1 vial, 12 ml
(7)	Solución de Lavado Conc. (20x) 	Tampón concentrado de fosfato con Tween-20	1 vial 58 ml
(8)	Solución de Parada 	1N H ₂ SO ₄ (ácido sulfúrico)	1 vial 12 ml

OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

ITEMS	Componentes
(1)	Micropipetas y puntas de 50µl y 100 µl
(2)	Incubadora o baño maría con control de temperatura a +37 °C.
(3)	Equipo para lavado de placas.
(4)	Lector de microplacas ELISA: Longitud de onda dual 450nm con longitud de onda de referencia de 620-690nm ^{*1} , ancho de banda 10nm.
(5)	Un analizador EIA de microplacas totalmente automático es opcional. El usuario debe validar el equipo en conjunto con el kit.

4.1) CONDICIONES DE ALMACENAJE Y ESTABILIDAD DEL KIT *

Kit/componentes	Condición de almacenaje	Estado	Estabilidad
ANTI-HBs ELISA kit	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control positivo Anti-HBs	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Negativo HB	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Placa HBsAg	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	2 mes
Solución Conjugado HBsAg HRPO	+2 to +8°C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Concentrada (20x)	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Diluida 20x	Temp ambiente	Diluido	2 días
	+2 to +8°C	Diluido	1 semana
TMB cromogénico concentrado	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Tampón del sustrato	+2 to +8°C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
2N ácido sulfúrico	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes

5) INSTRUCCIONES DE USO

5.1) Advertencias:

- 5.1.1) Este kit de reactivos es sólo para uso profesional.
- 5.1.2) Este kit de reactivos es sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 5.1.3) Procure que todos los reactivos del kit y las muestras alcancen temperatura ambiente (+20 to +30 °C) y mézclelos cuidadosamente antes de usar.
- 5.1.4) No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- 5.1.5) No intercambie reactivos entre lotes diferentes.
- 5.1.6) No pipetee con la boca.
- 5.1.7) No fume o coma en zonas donde se manipulan muestras o reactivos.
- 5.1.8) El control positivo, negativo, solución del conjugado y las muestras deben considerarse como peligros potenciales para la salud. Deben usarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio del usuario. Estos procedimientos de seguridad probablemente incluirán el uso guantes de protección y evitar la generación de aerosoles.

- 5.1.9) Las muestras potencialmente infecciosas y derrames o goteos que no contienen ácidos deben ser limpiados concienzudamente con hipoclorito de sodio al 5% o tratado de acuerdo con las prácticas del laboratorio para el control de un potencial riesgo biológico.
- 5.1.10) Antes de eliminar los desechos de las muestras usadas y reactivos del kit como desechos generales, estos deben ser tratados de acuerdo con el procedimiento local para desecho con potencial riesgo biológico o tratado como sigue:
Tanto los desechos sólidos como los líquidos deben ser autoclavados a +121 °C por lo menos por 30 minutos.
El desecho sólido también se puede incinerar.
El desecho líquido no ácido puede tratarse con hipoclorito de sodio diluido a una concentración final de 1%.
Los desechos ácidos deben ser neutralizados antes de tratarlos con hipoclorito de sodio como se mencionó antes y debe mantenerse por 30 minutos para obtener una desinfección efectiva.
- 5.1.11) La solución de parada es irritante para los ojos, la piel, vías respiratorias y membranas mucosas. Evite el contacto de la solución de parada con la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lave con copiosa cantidad de agua inmediatamente. En caso de inhalación, proporcione aire fresco y busque ayuda médica en caso de molestias.
- 5.1.12) El concentrado cromogénico TMB contiene disolvente orgánico que es tóxico: peligro de efectos graves irreversibles por inhalación, contacto con la piel o ingestión. El concentrado cromogénico TMB contiene dimetil sulfóxido, un irritante para la piel y membranas mucosas.
- 5.1.13) A pesar de que todo el material de origen humano ha resultado no reactivo para anti-VHC y Anti-VIH y ha sido inactivado a +56 °C por una hora, el reactivo debe manipularse como material potencialmente infeccioso.*2

5.2) Toma de Muestra y Preparación para el Análisis

- 5.2.1) El paciente no requiere preparación especial antes de la toma de la muestra. La sangre debe ser tomada con técnicas médicas aprobadas.
- 5.2.2) Con este kit se puede usar suero o plasma. La muestra de sangre total debe separarse lo antes posible para evitar hemólisis. Cualquier partícula presente en la muestra (por ej. glóbulos rojos, coágulos de fibrina) deben eliminarse antes de usar.
- 5.2.3) Las muestras deben almacenarse de +2 a +8 °C y evitar inactivación por calor para minimizar el deterioro. Para almacenar por periodos largos, las muestras se deben congelar por debajo de -20 °C. No se recomienda almacenarlas en congeladores que se auto descongelan.
- 5.2.4) Las muestras congeladas deben ser descongeladas completamente y mezcladas en forma homogénea antes del ensayo.
- 5.2.5) Evite congelar y descongelar en forma sucesiva
- 5.2.6) **ADVERTENCIA**

1. La muestra no debe contener compuestos de azida que puedan inhibir la actividad de la peroxidasa en el conjugado.
2. Muestras de suero coaguladas y muestras con contaminación bacteriana no deben ser usadas

5.3) Almacenaje del kit

- 5.3.1) El kit debe almacenarse entre +2 y +8 °C. No congelar.
- 5.3.2) Las tiras de las placas deben usarse dentro de 2 meses después de abrir la bolsa original de aluminio. Las tiras no usadas deben permanecer en la bolsa de aluminio firmemente sellada.
- 5.3.3) Almacene los reactivos nuevamente entre +2 y +8 °C inmediatamente después de su uso.
- 5.3.4) El concentrado (x20) de la solución de lavado es almacenado y transportado entre +2 y +8 °C, lo que puede causar cristalización. Si hay precipitado de cristales antes del uso, caliente la solución en un baño maría a +37 °C hasta que los cristales se disuelvan.

5.4) Procedimiento de lavado de placas

- 5.4.1) Preparación de la solución de lavado:
Diluya la solución de Lavado (x20) con agua destilada o desionizada a una dilución de 1:20. No use agua del grifo.
- 5.4.2) Lavado de las placas:
(a) Para un lavador de placas con función de aspiración de desborde: 6 ciclos de por lo menos 0,5 ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo
o

- (b) Para un lavador sin la función de aspiración de desborde: 8 ciclos de por lo menos 0,35ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo.
- 5.4.3) Seque invirtiendo la placa sobre un papel absorbente y golpeándola enérgicamente. Si queda demasiado tampón de lavado residual, podría causar resultados falsos.
- ¡**ADVERTENCIA!**!
- Un lavado inadecuado causará resultados falsos.

5.5) Procedimiento del Ensayo

- 5.5.1) Asegúrese de que todos los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente (+20 a +30 °C) antes del ensayo. Ajuste el baño maría o incubadora a $+37\pm 1$ °C.
- 5.5.2) Reserve un pocillo para el blanco. Agregue 50µl de cada control o muestra a los pocillos correspondientes en la placa donde ocurrirá la reacción (3 Controles Negativos y 2 Controles Positivos).



NOTA:

- a) Use una punta nueva de pipeta para cada muestra para evitar contaminación cruzada
- b) Cada placa necesita sus propios controles negativos, positivos y pocillo blanco.
- c) No use el valor de corte establecido para otras placas de ANTI-HBs ELISA.

- 5.5.3) Agregue 50 µl de solución de HBsAg· Peroxidasa a cada pocillo excepto a el blanco.



NOTA: No toque la pared del pocillo para evitar contaminación.

- 5.5.4) Agite la placa suavemente.
- 5.5.5) Retire el dorso protector de la cubierta autoadhesiva y presiónela sobre la placa de modo que quede sellada firmemente.
- 5.5.6) Incube la placa a $+37\pm 1$ °C en baño maría o una incubadora por 1 hora.
- 5.5.7) Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo
- “5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS”.
- 5.5.8) Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:

- A. Mezcle volúmenes iguales de **TMB cromogénico concentrado y Tampón de sustrato** en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue 100 µl de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo el pocillo blanco.
- B. Agregue primero **50 µl de TMB cromogénico concentrado** y luego agregue **50 µl de Tampón del sustrato** a cada pocillo incluyendo el blanco. Mezcle suavemente.



NOTA: El TMB cromogenico concentrado debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de TMB cromogénico concentrado con tampón del sustrato debe usarse dentro de 30 minutos a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

- 5.5.9) Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 5.5.10) Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco.
- 5.5.11) Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 30 minutos con un fotómetro de precisión a 450 / 620-690 nm (Longitud de onda de 450 nm para la lectura con 620-690 nm de longitud de onda de referencia)*⁷ Use el blanco para blanquear el fotómetro.



NOTA:

El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el ensayo es inválido.
Blanco Sustrato: la absorbancia debe ser menor de 0,100.

5.6) Cálculo de los resultados del ensayo

5.6.1) Cálculo de la CNx (Absorbancia promedio del Control Negativo).

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.015
2	0.016
3	0.014

$$CNx = (0.015 + 0.016 + 0.014) / 3 = 0.015$$

CNx debe ser $\leq 0,2$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.6.2) Cálculo de CPx (Absorbancia Promedio del Control Positivo)

Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.846
2	0.902

$$CPx = (0.846 + 0.902) / 2 = 0.874$$

CPx debe ser $\geq 0,5$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.6.3) Cálculo del Valor P-N

$$P-N = CPx - CNx$$

Ejemplo: CNx = 0.015

$$CPx = 0.874$$

$$P - N = 0.874 - 0.015 = 0.859$$

El valor P - N debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido.

5.6.4) Cálculo del Valor de Corte

$$\text{Valor de Corte} = CNx + 0.025$$

$$\text{Ejemplo: Valor de Corte} = 0.015 + 0.025 = 0.040$$

5.6.5) Cálculo del Rango de Repetición

$$\text{Rango de Repetición} = \text{Valor de Corte} \pm 10\%$$

Ejemplo: Valor de Corte = 0.040

$$\text{Rango de Repetición} = (0.040 - 0.004) \text{ a } (0.040 + 0.004) = 0.036 \text{ a } 0.044$$

5.7) Validez de los Ensayos

5.7.1) **CNx debe ser $\leq 0,2$ de otro modo el ensayo es inválido.**

5.7.2) **CPx debe ser $\geq 0,5$ de otro modo el ensayo es inválido.**

5.7.3) **Valor de P-N debe ser $\geq 0,3$ de otro modo el ensayo es inválido**

NOTA: Control Negativo: la absorbancia debe ser menor o igual a 0,200 después de restar el blanco.

5.8) Interpretación de los Resultados

5.8.1) Las muestras con absorbancias menores de (0,9 x Valor de Corte) se consideran como NO-REACTIVAS y se consideran NEGATIVAS para Anti-HBs.

5.8.2) Las muestras con una absorbancia mayor de (1,1 x Valor de Corte) se consideran como REACTIVAS y se consideran POSITIVAS para Anti-HBs.

5.8.3) Las muestras con absorbancias dentro del Rango de Repetición (Valor de Corte $\pm$ 10%) deben ser repetidas en duplicado e interpretadas como se ha descrito.

Muestras con resultados de la repetición dentro del rango de repetición se informan como "indeterminadas". Se sugiere que las muestras con resultados "indeterminados" sean analizadas posteriormente.

5.9) Solución de Problemas

Si el resultando no puede ser reproducido, una solución preliminar podría obtenerse revisando las posibilidades mencionadas a continuación:

- 5.9.1) Procedimiento de lavado inadecuado.
- 5.9.2) Muestra contaminada con positivo.
- 5.9.3) Volumen de muestra, conjugado o sustrato equivocado.
- 5.9.4) Contaminación del borde del pocillo con conjugado.
- 5.9.5) Muestra inadecuada, p.ej. suero o plasma hemolizados, muestra con precipitado, muestra no suficientemente mezclada antes del uso.
- 5.9.6) Tiempo o temperatura de incubación equivocados.
- 5.9.7) Cabeza y agujas de la lavadora para dispensar/aspirar total o parcialmente obstruidas.
- 5.9.8) Aspiración insuficiente.

5.10) Limitaciones e Interferencias

- 5.10.1) Este kit de reactivos es para ser usado con muestras de suero o plasma humano individual.
- 5.10.2) El kit no ha sido validado par uso con muestras de cadáver.
- 5.10.3) Resultados falsos positivos no reproducibles pueden producirse en cualquier kit de inmunoensayo enzimático, principalmente debido a error técnico ya sea de parte del operador o funcionamiento defectuoso del aparato usado.
- 5.10.4) Ocasionalmente se pueden obtener resultados reactivos falsos en forma reiterada ($\leq 2\%$).
- 5.10.5) Un resultado Anti-HBs negativo sin más evidencia no descarta la posibilidad de una infección previa por el virus de la hepatitis B.
- 5.10.6) Un resultado positivo (bajo) en anti-HBs ELISA no es prueba de protección y como tal no debe ser utilizado para excluir una infección por virus de la hepatitis B.
- 5.10.7) Es posible que las muestras positivas para Anti-HBs no siempre muestren propiedades lineales al hacer diluciones seriadas como ocurre en la dilución de material estándar.
- 5.10.8) Sustancias que podrían interferir:
Los siguientes resultados se obtuvieron en los respectivos experimentos:
 - 1. No se ha observado interferencia con diferentes anticoagulantes tales como heparina con litio, K-EDTA, citrato de sodio.
 - 2. Muestras que han sido tratadas con calor (+60°C, 10 horas) resultaron con títulos de HBsAg disminuidos.
 - 3. No se detectó reacción cruzada al usar muestras de pacientes con a) otras infecciones VHA, VEB, CMV, VHS, VZV, Borreliosis de Lyme, VHC, VHI, b) con otras enfermedades tales como insuficiencia renal crónica, hemodiálisis, hepatitis autoinmune, cirrosis hepática y c) con algunos anticuerpos tales como HAMA, GAD, IA2, APS).
 - 4. Las muestras que contienen sustancias que podrían interferir [P. ej. Triglicéridos (lipemia), hemoglobina (hemolisis) bilirrubina (ictericia) componentes de la inmunoglobulina monoclonal, niveles altos de anticuerpos autoinmunes (factor reumatoide-FR, anticuerpos anti nucleares-ANA, o anticuerpos anti mitocondria-AMA)] y muestras de mujeres embarazadas, no interfirieron con el ensayo Elisa Anti-HBs.

5.11) Características del Ensayo

5.11.1) Especificidad Diagnostica

Resultados de la Evaluación Europea del Desempeño del Elisa Anti-HBs de DIASource – La Reactividad del “Donante” Negativo para VHB y Muestras “Clínicas”.

Muestra Negativa para Anti-HBs	No. de muestras	Negativos
Muestras de donantes no seleccionados	400	400
Pacientes hospitalizados	134	134
Muestras con posible interferencia	50	49
Total	584	583

Especificidad Diagnóstica = $583/584 = 99.83\%$

5.11.2) Sensibilidad Analítica:

El límite de detección se determina utilizando diluciones de estándares

La sensibilidad analítica fue determinada en 3,6 mIU/ml de anti-HBs para el ensayo Anti-HBs ELISA de DIAsource usando entre otros el estándar PEI Anti-HBs.

El M/C para 10 mIU/ml de anti-HBs fue de alrededor de 1,60. Para ensayos de rutina, puede ser útil y práctico incrementar el valor de corte para los resultados positivos a 1,6x estándar/C para obtener un corte de aproximadamente 10 mIU/ml de Anti-HBs (“título protector”).

5.11.3) Linealidad del ensayo usando muestras de sangre

Se evaluó la linealidad usando dos muestras de suero positivas para Anti-HBs de alto título y diluyéndolas cubriendo todo el rango medible del ensayo y luego alrededor del nivel de corte en diluciones seuidas.

Anti-HBs ELISA de DIAsource mostró un comportamiento lineal entre las diluciones 3,6 y 240 IU/ml.

5.11.4) Especificidad Diagnóstica

Muestras positivas/Muestras utilizadas para evaluar la sensibilidad/ Pacientes con infección por VHB.

5.11.4.1) Individuos infectados con VHB

Muestras positivas para Anti-HBs	No. de muestras	Positivos
Individuos infectados en forma natural	125	125
Individuos vacunados contra Hep B	111	111
Total	235	235

Especificidad Diagnóstica = $235/235 = 100\%$

5.11.4.2) Paneles de seroconversión Comerciales

Se usaron 4 paneles de seroconversión disponibles en el comercio, consistentes en muestras de seguimiento que fueron tomadas semanal o mensualmente de pacientes con hepatitis B aguda.

El ensayo ANTI-HBs ELISA es más sensible que el ensayo Anti-HBs de referencia.

5.11.4.3) Muestras posteriores para seguimiento

Se obtuvieron muestras de 22 sujetos sanos que fueron vacunados contra la hepatitis B. Los ensayos se hicieron en muestras tomadas antes y 3 y 6 meses después de la vacunación contra la hepatitis B. Se detectó seroconversión de Anti-HBs en todos los sujetos en las muestras de los 3 meses usando el ensayo ANTI-HBs ELISA. Por otro lado, el ensayo Anti-HBs de referencia mostró seroconversión en 20 sujetos a los 3 meses de la vacunación, mientras que en los otros dos la seroconversión se observó solo en las muestras obtenidas a los 6 meses de la vacunación. Esto indica que el Elisa Anti-HBs es más sensible que el ensayo de referencia Anti-HBs.

5.11.5) Evaluación de la Precisión

5.11.5.1) Exactitud: repetibilidad intra-ensayo y reproducibilidad entre ensayos

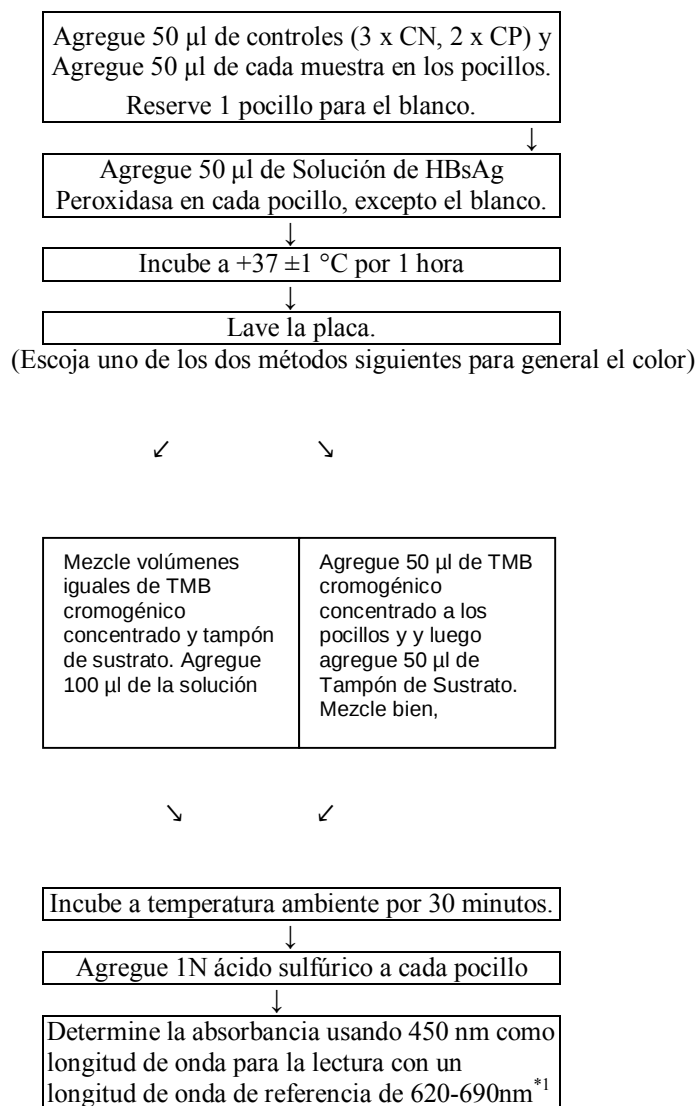
El control positivo del ensayo Anti-HBs ELISA (800 mIU/ml) y dos muestras de suero con niveles de Anti-HBs justo sobre el corte y a nivel medio, fueron analizados repitiendo 20 veces un ensayo único por tres días. Los resultados se utilizaron para calcular la repetibilidad intra ensayo y la reproducibilidad entre ensayos como se muestra en las siguientes tablas.

Ítem analizado		Nº de muestras	precisión
Control Positivo	intra-ensayo	N = 20	CV 10.27%
	entre-ensayo	N = 60	CV 7.11%
Suero Paciente #1	intra-ensayo	N = 20	CV 7.57%
	entre-ensayo	N = 60	CV 7.17%
Suero Paciente #2	intra-ensayo	N = 20	CV 9.05%
	entre-ensayo	N = 60	CV 7.71%

5.11.6) Seguimiento

El Calibrador maestro anti-HBs de DIAsource ha sido calibrado contra el estándar WHO Anti-HBs-IgG (W1042) usando el ensayo ELISA anti-HBs. La potencia relativa del estándar WHO Anti-HBs versus el Calibrador maestro anti-HBs de DIAsource es 1,205 (1,117-1,297 95% CI). La concentración de anti-HBs del Control Positivo del ensayo ELISA anti-HBs ha sido determinada contra el Calibrador maestro anti-HBs de DIAsource y fue establecida en 800 mIU/ml $\pm$ 20%.

5.12) Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo



6) NOTAS

- *1 La longitud de onda de referencia del espectrofotómetro puede ser de 620nm a 690nm. Sin embargo el usuario debe validar el fotómetro en conjunto con este kit antes de su uso.
- *2 Inactivación incompleta del virus de la hepatitis B después de tratamiento con calor a +60°C por 10 horas, J. Infect. Dis. 138:242-244.

7) BIBLIOGRAFÍA

1. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Sem Liver Disease. 1991;11:73–83.
2. Lander JJ, Holland PV, Alter HJ, Chanock RM, Purcell RH. Antibody to hepatitis-associated antigen. Frequency and pattern of response as detected by radioimmunoprecipitation. J Am Med Assoc. 1972;220:1079–1082.
3. Deinhardt F, Zuckerman AJ. Immunization against hepatitis B: Report on a WHO meeting on viral hepatitis in Europe; J Med Virology 1985;17:209 – 217.
4. Ambrosch F, Courouce AM, Coursaget P et al. International Group. Immunisation against hepatitis B. Lancet 1988;16: 875-876.
5. Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F. Persistence of specific antibodies after hepatitis B vaccination. Hepatol. 1988; 6:201-207.
6. European Consensus Group on Hepatitis B immunity: Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? Lancet. 2000;355:561–565.

Fecha de revisión: 2011-06-27



Anti-HBs Elisa

pl

Do jakościowego oznaczania przeciwciał przeciwko antygenowi powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B (anty-HBs) w ludzkiej surowicy lub osoczu.

KAPG4SBE3

DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia

Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1) PRZEZNACZENIE

Anti-HBs Elisa jest zestawem diagnostycznym, zawierającym test immunologiczny do jakościowego oznaczania przeciwciał przeciwko antygenowi powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B (anty-HBs) w ludzkiej surowicy lub osoczu. (pobranym na heparynę, cytrynian lub EDTA).

Test ten może być stosowany przed lub po szczepieniu przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B, w celu oceny stanu immunologicznego pacjenta, jak również jako pomoc w rozpoznawaniu i monitorowaniu zakażeń tym wirusem.

2) STRESZCZENIE I WYJAŚNIENIE ZASADY DZIAŁANIA TESTU

Antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) jest pierwszym antygenem, który pojawia się w przebiegu zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B. Do pojawienia się przeciwciał przeciwko HBsAg (anty-HBs) dochodzi u 90% pacjentów zakażonych HBV w późnym okresie rekonwalescencji, około 3 do 4 miesięcy po pojawieniu się początków choroby i jest to powiązane z ustąpieniem zakażenia oraz pojawieniem się odporności immunologicznej. Brak przeciwciał anty-HBs stanowi wskaźnik wrażliwości na zakażenie HBV i pozwala zidentyfikować osoby, dla których korzystne może być szczepienie. WHO donosi, że ludzie z mianem przeciwciał antyHBs, równym 10 mIU/ml, mogą być uznawani za chronionych (seroprotekcja) przed zakażeniem HBV. Oznaczanie przeciwciał anty-HBs jest przydatne w badaniach przesiewowych przed immunizacją, jak również w celu ustalenia wystąpienia serokonwersji po zakażeniu lub w wyniku aktywnej immunizacji szczepionką przeciwko zapaleniu wątroby typu B. Miana przeciwciał anty-HBs na poziomie < 100 mIU/ml wskazują na niedostateczną odpowiedź, która wymaga doszczepienia w ciągu jednego roku. Ponadto, oznaczanie przeciwciał anty-HBs jest przydatne do monitorowania przebiegu choroby po ostrym zakażeniu HBV.

Test **Anti-HBs Elisa** jest szybkim testem do jakościowego oznaczania obecności przeciwciał przeciwko HBsAg w próbkach surowicy lub osocza (pobranym na heparynę, cytrynian lub EDTA). Test wykorzystuje antygen HBsAg znajdujący się w studzienkach oraz antygeny związane z peroksydazą.

Próbki ujemne w teście Anti-HBs Elisa są traktowane jako ujemne pod względem obecności przeciwciał anty-HBs. Próbki dodatnie powinny być ponownie, podwójnie przetestowane.

Test musi być powtórzony dwukrotnie w przypadku próbek, których absorbancje mieszczą się w zakresie dla ponownych oznaczeń (Retest Range) (wartość odcięcia $\pm 10\%$).

3) OPIS TESTU

Test Anti-HBs Elisa jest testem immunoenzymatycznym, przeprowadzanym w fazie stałej (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay), zbudowanym na "zasadzie kanapkowej". Faza stała mikropłytki jest wykonana z polistyrenowych studzienek opłaszczonych HBsAg (podtypy Ad i Ay), oraz fazy płynnej, którą stanowi koniugat HBsAg z peroksydazą (podtyp Ad i Ay).

Gdy próbka surowicy lub osocza zawierająca przeciwciała anty-HBs zostanie dodana do studzienek opłaszczonych antygenem HBsAg wraz z antygenem HBsAg związanym z peroksydazą, wówczas w studzienkach będą powstawać kompleksy (antygen)-(anty-HBs)-(antygen • peroksydaza). Po przepłukaniu mikropłytki, w celu usunięcia niezwiązanego materiału, do studzienek dodawany jest roztwór substratu TMB i są one inkubowane. Powstające zabarwienie jest proporcjonalne do ilości przeciwciał anty-HBs związanych z HBsAg. Reakcja peroksydazy z TMB jest zatrzymywana dodaniem kwasu siarkowego. Gęstość optyczna powstałego zabarwienia jest odczytywana odpowiednim fotometrem na długości fali 450 nm z referencyjną długością fali w przedziale 620 do 690 nm⁻¹.

Powyższa zasada testu została również przedstawiona na poniższym rysunku.

A Próbka zawierająca przeciwciała anty-HBs:

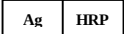
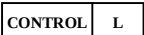
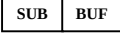
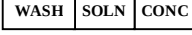
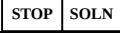
1. Studzienka (HBsAg) + próbka (anty-HBs) + HBsAg • peroksydaza
→ Kompleks kanapkowy HBsAg • anty-HBs • (HBsAg • peroksydaza)
2. Kompleks kanapkowy + roztwór substratu TMB
→ Kolor jasnoniebieski do niebieskiego
3. Dodanie kwasu siarkowego, w celu zatrzymania reakcji barwnej
→ Odczyt OD przy 450 nm/620-690 nm⁻¹

B Próbka niezawierająca przeciwciał anty-HBs:

1. Studzienka (HBsAg) + próbka (brak anty-HBs) + HBsAg • peroksydaza
→ HBsAg (w studzienke)
2. HBsAg (w studzienke) + roztwór substratu TMB
→ Brak koloru do koloru jasnoniebieskiego
3. Dodanie kwasu siarkowego, w celu zatrzymania reakcji barwnej
→ Odczyt OD przy 450 nm/620-690 nm⁻¹

4) OPIS DOSTARCZONYCH MATERIAŁÓW

- Elementy 1 - 6 w poniższej tabeli odczynników powinny być schłodzone do +2 do +8°C . Roztwór płuczący (20x) i roztwór zatrzymujący reakcję powinny być przechowywane w temperaturze +2 do +30°C.

ELEMENT	Składniki	Opis	Ilość na 96 testów
(1)	Płytki HBsAg 	Mikropłytki opłaszczona HBsAg	1 płytki
(2)	Roztwór HBsAg związanego z peroksydazą 	Koniugat HBsAg HRPO rozcieńczony w buforze ze stabilizatorami białkowymi. Środki konserwujące: 0,003% gentamycyna i 0,01% timerosal.	1 butelka, 8 ml
(3)	Kontrola dodatnia anti-HBs 	Inaktywowana ludzka surowica zawierająca przeciwciała anti-HBs w buforze ze stabilizatorami białkowymi. Środki konserwujące: 0,003% gentamycyna i 0,01% timerosal.	1 butelka, 1,5 ml
(4)	Kontrola ujemna HB 	Surowica niereaktywna pod kątem markerów obecności HBV w buforze ze stabilizatorami białkowymi. Środki konserwujące: 0,003% gentamycyna i 0,01% timerosal.	1 butelka, 2 ml
(5)	Koncentrat chromogenu TMB 	0,6 mg/ml 3, 3', 5, 5'-tetrametylobenzydyny (TMB) w zasada organicznej.	1 butelka, 12 ml
(6)	Bufor substratu 	Bufor z kwasem cytrynowym, zawierający 0,03% H ₂ O ₂ .	1 butelka, 12 ml
(7)	Stężony roztwór płuczający (20x) 	Stężony bufor fosforanowy z Tween-20	1 butelka, 58 ml
(8)	Roztwór zatrzymujący 	1N H ₂ SO ₄ (kwas siarkowy)	1 butelka, 12 ml

• INNE MATERIAŁY WYMAGANE LECZ NIEZAWARTE W ZESTAWIE

ELEMENT	Składniki
(1)	Potrzebne są mikropipety 50 µl, 100 µl oraz końcówki.
(2)	Łaźnia wodna lub inkubator z temperaturą kontrolowaną na poziomie +37°.
(3)	Wyposażenie do przepłukiwania mikropłytek
(4)	Czytnik mikropłytek ELISA: o odczycie dwóch długości fali - 450nm z referencyjną długością fali 620-690nm, szerokość pasma 10nm ⁻¹ .
(5)	Wyposażenie opcjonalne stanowi całkowicie automatyczny analizator mikropłytek EIA. Użytkownik powinien walidować użycie z tym zestawem automatycznego analizatora mikropłytek EIA.

4.1) Warunki przechowywania i stabilność zestawu *

Zestaw/komponenty	Warunki przechowywania	Stan	Stabilność
Zestaw Anti-HBs Elisa	od +2 do +8°C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Kontrola dodatnia anti-HBs	od +2 do +8°C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Kontrola ujemna HB	od +2 do +8°C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Płytki HBsAg	od +2 do +8°C	Oryginalny	24 miesiące

		Raz otwarty	2 miesiące
Roztwór koniugatu HBsAg HRPO	od +2 do +8°C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Stężony roztwór płuczący (20X)	Temp. pokojowa	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc
20X rozcieńczony roztwór płuczący	Temp. pokojowa	Rozcieńczony	2 dni
	od +2 do +8°C	Rozcieńczony	1 tydzień
Koncentrat chromogenu TMB	od +2 do +8°C	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc
Bufor substratu	od +2 do +8°C	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc
Kwas siarkowy 2N	Temp. pokojowa	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc

5) INSTRUKCJA OBSŁUGI

5.1) Ostrzeżenie:

- 5.1.1) Niniejszy zestaw odczynników jest przeznaczony tylko do użytku profesjonalnego.
- 5.1.2) Niniejszy zestaw odczynników jest przeznaczony wyłącznie do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- 5.1.3) Przed użyciem należy przynieść wszystkie odczynniki zestawu i próbki do pomieszczenia o temperaturze pokojowej (+20 do +30°) i starannie wymieszać.
- 5.1.4) Odczynników nie wolno używać po upływie terminu ważności.
- 5.1.5) Nie wolno mieszać odczynników pochodzących z różnych serii.
- 5.1.6) Nie wolno pipetować ustami.
- 5.1.7) W pomieszczeniach, w których znajdują się próbki lub odczynniki, nie wolno palić ani spożywać posiłków.
- 5.1.8) Kontrola dodatnia, kontrola ujemna, roztwór koniugatu i próbki należy traktować jako materiały potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia. Materiały te powinny być stosowane i usuwane zgodnie z obowiązującymi w Twoim laboratorium procedurami bezpieczeństwa. Takie procedury bezpieczeństwa mogą obejmować noszenie rękawic ochronnych i unikanie wytwarzania aerozoli.
- 5.1.9) Potencjalnie zakaźne próbki oraz rozlane ciecze inne niż kwasy, a także ciecze, które wypłynęły w wyniku nieszczelności, należy starannie wytrzeć, stosując 5% podchloryn sodowy lub usunąć w sposób zgodny z lokalnie obowiązującymi procedurami zwalczania zakażeń.
- 5.1.10) Przed usunięciem zużytych próbek i odczynników wchodzących w skład zestawu wraz z normalnymi odpadami, należy postąpić z nimi zgodnie z lokalnie obowiązującymi procedurami dotyczącymi postępowania z odpadami potencjalnie niebezpiecznymi biologicznie lub postąpić z nimi w następujący sposób:
 Zarówno odpady płynne, jak i stałe powinny być autoklawowane w temperaturze +121°C przez przynajmniej 30 minut.
 Odpady stałe mogą być również palone.
 Odpady płynne, inne niż kwaśne, mogą być traktowane podchlorynem sodowym, rozcieńczonym do 1%.
 Kwaśne odpady płynne przed potraktowaniem podchlorynem sodowym muszą zostać zneutralizowane w sposób wspomniany powyżej i powinny być odkażane przez 30 minut, celem zapewnienia jego skuteczności.
- 5.1.11) Roztwór zatrzymujący reakcję jest drażniący dla skóry, oczu, dróg oddechowych i błon śluzowych. Należy unikać kontaktu roztworu zatrzymującego reakcję z błonami śluzowymi. W razie kontaktu, dotknięte miejsce należy natychmiast zmyć dużą ilością wody. W przypadku inhalacji należy zapewnić poszkodowanemu dostęp świeżego powietrza i w razie jakichkolwiek objawów skontaktować się z lekarzem.
- 5.1.12) Koncentrat chromogenu TMB zawiera rozpuszczalnik organicznego, który jest toksyczny: wdychanie, kontakt ze skórą i połknięcie środka grozi poważnymi, nieodwracalnymi konsekwencjami zdrowotnymi.
 Koncentrat chromogenu TMB zawiera sulfotlenek dimetylu, który jest drażniący dla skóry i błon śluzowych.
- 5.1.13) Jakkolwiek wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego zostały zbadane i okazały się niereaktywne względem przeciwciał anty-HCV and anty-HIV, oraz były inaktywowane przez jedną godzinę w +56°C, należy postępować z nimi jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi.²

5.2) Pobieranie próbek i przygotowanie do oznaczenia

- 5.2.1) Przed pobraniem krwi nie są wymagane żadne specjalne przygotowania pacjenta. Krew powinna być pobierana w sposób zgodny z akceptowaną praktyką medyczną.
- 5.2.2) Z tym zestawem testowym można stosować zarówno próbki surowicy, jak i osocza. Próbkę krwi pełnej należy jak najszybciej odseparować, w celu uniknięcia hemolizy. Jakkolwiek składniki cząsteczkowe (np. skrzepy włókniaka, erytrocyty) należy usunąć z próbki przed użyciem.

5.2.3) Próbkę muszą być przechowywane w temperaturze +2 do +8°C, aby uniknąć ich inaktywacji cieplnej oraz pogorszenia jakości materiału. Do długotrwałego przechowywania, próbki należy zamrozić do -20°C. Przechowywanie w samorozmrażającej się zamrażarce nie jest zalecane.

5.2.4) Zamrożone próbki muszą zostać przed oznaczeniem starannie rozmrożone i wymieszane, w celu zapewnienia homogenności.

5.2.5) Należy unikać wielokrotnego powtarzania cykli zamrażania-rozmrażania.

5.2.6) OSTRZEŻENIE

1. Próbkę nie może zawierać żadnych AZYDKÓW, które mogą hamować aktywność peroksydazy zawartej w koniugacie.
2. Nie należy stosować nie w pełni wykrzepionej surowicy ani próbek zawierających zanieczyszczenia bakteryjne.

5.3) Przechowywanie odczynników

5.3.1) Zestaw musi być przechowywany w temperaturze +2 do +8°C. Nie zamrażać.

5.3.2) Paski mikropłytki powinny zostać zużyte w ciągu 2 miesięcy od momentu otwarcia oryginalnego woreczka z folii aluminiowej. Nieużywane paski powinny być przechowywane w woreczku z folii aluminiowej i szczelnie zaklejone taśmą.

5.3.3) Zaraz po użyciu, ponownie umieść odczynniki w temperaturze +2 do +8°C.

5.3.4) Stężony (20x) roztwór płuczący można przechowywać w temperaturze pokojowej, w celu uniknięcia krystalizacji, gdyż zestawy są przechowywane i wysyłane przy temperaturze +2 do +8°C. Jeżeli przed użyciem dojdzie do wytrącenia się kryształów, ogrzej roztwór w łaźni wodnej do +37°C aż kryształy się rozpuszczą.

5.4) Procedura przemywania płytki

5.4.1) Przygotowanie roztworu płuczącego:

Rozcieńcz stężony (20x) roztwór płuczący destylowaną lub dejonizowaną wodą, aby osiągnąć rozcieńczenie 1:20. Nie używaj wody wodociągowej.

5.4.2) Przemywanie płytki:

(a) W przypadku płuczki do płytek z funkcją aspiracji przelewanego roztworu: 6 cykli z przynajmniej 0,5 ml buforu płuczącego na studzienkę na cykl.

Lub

(b) W przypadku płuczki do płytek bez funkcji aspiracji przelewanego roztworu: 8 cykli z przynajmniej 0,35 ml buforu płuczącego na studzienkę na cykl.

5.4.3) Wysusz płytkę, odwracając ją i układając na papierze absorpcyjnym i silnie obstukując. Zbyt dużo pozostałości buforu przemywającego w studzienkach prowadzi do błędnych wyników.

OSTRZEŻENIE

Niewłaściwe przemywanie jest powodem błędnych wyników.

5.5) Procedura testowa

5.5.1) Przed rozpoczęciem oznaczenia przynieś wszystkie odczynniki i próbki do pomieszczenia o temperaturze pokojowej (+20 do +30°C). Ustaw temperaturę łaźni wodnej lub inkubatora na +37±1°C.

5.5.2) Zarezerwuj jedną studzienkę na próbę ślepą. Dodaj 50µl każdej kontroli lub próbki do odpowiednich studzienek płytki reakcyjnej (3 kontrole ujemne i 2 kontrole dodatnie).



UWAGA:

- a) W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego, pobierając każdą próbkę, użyj czystej końcówki pipety.
- b) Każda płytka wymaga użycia własnej kontroli ujemnej, dodatniej oraz studzienki ślepej próby.
- c) Nie można stosować żadnych wartości odcięcia, określonych dla innych płytek testu Anti-HBS Elisa.

5.5.3) Dodaj 50 µl roztworu HBsAg • peroksydaza do każdej studzienki poza studzienką próby ślepej.



UWAGA:

Aby zapobiec zanieczyszczeniu, nie wolno dotykać ściany studzienki.

5.5.4) Delikatnie obstukaj płytkę.

5.5.5) Zdejmij z samoprzylepnego paska warstwę zabezpieczającą i dociśnij go do płytki reakcyjnej tak, aby ją uszczelnić.

5.5.6) Inkubuj płytkę reakcyjną w łaźni wodnej lub w inkubatorze o temperaturze +37±1°C przez 1 godzinę.

5.5.7) Pod koniec okresu inkubacji, zdejmij i wyrzuć samoprzylepny pasek i przemyj płytkę zgodnie z procedurą przemywania płytki przedstawioną w punkcie 5.4).

5.5.8) Wybierz jedną z następujących dwóch metod przeprowadzania reakcji barwnej:

A. Tuż przed użyciem, wymieszaj w czystym pojemniku równe objętości koncentratu chromogenu TMB i **buforu substratu**. Dodaj po **100 µl** mieszaniny do każdej studzienki, łącznie ze studzienką próby ślepej.

B. Najpierw dodaj **50 µl** koncentratu chromogenu TMB i następnie dodaj **50 µl** buforu substratu do każdej studzienki, łącznie ze studzienką próby ślepej. Starannie wymieszaj zawartość studzienek.

**UWAGA:**

Koncentrat chromogenu TMB powinien być bezbarwny do jasnoniebieskiego, w innym przypadku należy go wyrzucić. Mieszanina koncentratu chromogenu TMB i buforu substratu powinna być zużyta w ciągu 30 minut od momentu wymieszania. Mieszaniny nie należy wystawiać na działanie intensywnego światła.

- 5.5.9) Przykryj płytkę czarnym zakryciem i inkubuj w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
- 5.5.10) Zatrzymaj reakcję dodając do każdej studzienki łącznie ze studzienką ślepej próby po 100µl roztworu zatrzymującego reakcję.
- 5.5.11) Posługując się precyzyjnym fotometrem, w ciągu 30 minut odczytaj absorbancję kontroli i próbek badanych dla długości fali 450 / 620-690 nm (długość fali odczytu – 450, referencyjna długość fali 620-690 nm)⁷. Użyj studzienki ślepej do wyzerowania fotometru.



UWAGA: Kolor próby ślepej powinien być bezbarwny do jasnożółtego, w przeciwnym razie wyniki oznaczenia są nieważne. Próba ślepa: wartość absorbancji musi być niższa od 0,100.

5.6) Wyliczanie wyników testu

5.6.1) Obliczanie NCx (średniej absorbancji kontroli ujemnej).

Przykład: Nr próbki Absorbancja
 1 0,015
 2 0,016
 3 0,014
 $NCx = (0,015 + 0,016 + 0,014) / 3 = 0,015$

NCx musi być $\leq 0,2$, w przeciwnym razie test jest nieważny.

5.6.2) Obliczanie PCx (średniej absorbancji kontroli dodatniej).

Przykład: Nr próbki Absorbancja
 1 0,846
 2 0,902
 $PCx = (0,846 + 0,902) / 2 = 0,874$

PCx musi być $\geq 0,5$, w przeciwnym razie test jest nieważny.

5.6.3) Obliczanie wartości P - N

P - N = PCx - NCx
 Przykład: NCx = 0,015
 PCx = 0,874
 $P - N = 0,874 - 0,015 = 0,859$

Wartość P - N musi być $\geq 0,3$, w przeciwnym razie test jest nieważny.

5.6.4) Obliczanie wartości odcięcia

Wartość odcięcia = NCx + 0,025
 Przykład: Wartość odcięcia = 0,015 + 0,025 = 0,040

5.6.5) Obliczanie zakresu dla powtórzenia testu (Retest Range)

Retest Range = wartość odcięcia $\pm 10\%$
 Przykład: Wartość odcięcia = 0,040
 $Retest Range = (0,040 - 0,004) \text{ do } (0,040 + 0,004) = 0,036 \text{ do } 0,044$

5.7) Ważność serii testów

- 5.7.1) **NCx powinien być $\leq 0,2$, w przeciwnym razie test jest nieważny.**
- 5.7.2) **PCx powinno być $\geq 0,5$, w przeciwnym razie test jest nieważny.**
- 5.7.3) **Wartość P - N musi być $\geq 0,3$, w przeciwnym razie test jest nieważny.**

UWAGA: Kontrola ujemna: wartość absorbancji po odjęciu absorbancji próby ślepej musi być niższa lub równa 0,200.

5.8) Interpretacja wyników

- 5.8.1) Próbki o wartościach absorbancji poniżej (0,9 x wartość odcięcia) są NIEREAKTYWNE w teście i UJEMNE od względem obecności przeciwciał anti-HBs.
- 5.8.2) Próbki o wartościach absorbancji powyżej (1,1 x wartość odcięcia) są REAKTYWNE w teście i DODATNIE pod względem obecności przeciwciał anti-HBs.
- 5.8.3) Próbki o wartościach absorbancji mieszczących się w Retest Range (wartość odcięcia $\pm 10\%$) powinny być ponownie dwukrotnie oznaczone i zinterpretowane jak wyżej.
- Próbki, których dowolne z powtórzonych wyników mieszczą się w zakresie powtórnego oznaczenia, są określane jako „nieokreślone”. Zaleca się, aby w przypadku próbek „nieokreślonych” przeprowadzać badania kontrolne.

5.9) Rozwiązywanie problemów technicznych

Jeżeli wyniku nie udaje się powtórzyć, wykonaj wstępne czynności kontrolne przedstawione poniżej:

- 5.9.1) Niewłaściwa procedura przemywania.
- 5.9.2) Zanieczyszczenie próbką dodatnią.
- 5.9.3) Niewłaściwa objętość próbki, koniugatu lub substratów.
- 5.9.4) Zanieczyszczenie obrzeża studzienki koniugatem.
- 5.9.5) Nieprawidłowa próbka, przykładowo zhemolizowana surowica lub osocze, próbka zawierająca osady, bądź próbka przed użyciem niestannie wymieszana.
- 5.9.6) Niewłaściwa temperatura lub czas inkubacji.
- 5.9.7) Całkowicie lub częściowo niedrożna płuczka, głowica aspirująco-dozująca i igły.
- 5.9.8) Niedostateczna aspiracja.

5.10) Ograniczenia i interferencje

- 5.10.1) Ten zestaw odczynników jest przeznaczony do użycia z ludzkimi surowicami lub osoczami niezbiornymi.
- 5.10.2) Ten zestaw odczynników nie został walidowany do stosowania z próbkami pobranymi ze zwłok.
- 5.10.3) Niepowtarzalne wyniki fałszywie dodatnie można uzyskać w przypadku każdego testu immunoenzymatycznego, najczęściej z powodu błędu technicznego wynikłego z działania operatora lub niesprawności aparatu.
- 5.10.4) Wyjątkowo mogą być uzyskiwane powtarzalne wyniki fałszywie dodatnie ($\leq 2\%$).
- 5.10.5) Wynik ujemny w teście anti-HBs bez obecności innych dowodów, nie wyklucza możliwości uprzedniej infekcji wirusem zapalenia wątroby typu B.
- 5.10.6) Wynik dodatni (niski) w teście Anti-HBs ELISA nie jest dowodem istnienia ochrony i w związku z tym nie powinien być stosowany do wykluczenia istnienia zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B.
- 5.10.7) Próbkę dodatnie w teście anti-HBs mogą nie zawsze charakteryzować się liniową zależnością właściwości seryjnych rozcieńczeń, jak w przypadku seryjnych rozcieńczeń standardowego materiału.
- 5.10.8) Substancje potencjalnie interferujące:
W poszczególnych badaniach uzyskano następujące rezultaty:
 1. Nie zaobserwowano żadnych interferencji związanych z użyciem różnych środków przeciwwirycznych, takich jak heparyna litowa, K-EDTA i cytrynian sodowy.
 2. Próbkę potraktowaną podwyższoną temperaturą (+60°C, 10 godzin) charakteryzowały się niższym mianem HBsAg.
 3. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w przypadku próbek uzyskanych od pacjentów a) z innymi infekcjami, takimi jak: HAV, EBV, CMV, HSV, VZV, boreliozą Lyme, HCV, HIV, b) z innymi stanami chorobowymi, takimi jak przewlekła niewydolność nerek, hemodializami, autoimmunologicznym zapaleniem wątroby, marskością wątroby i c) posiadającymi pewne przeciwciała, takie jak HAMA, GAD, IA2, APS).
 4. Próbkę zawierające substancje potencjalnie interferujące [np. triglicerydy (lipemia), hemoglobinę (hemoliza), bilirubinę (żółtaczkę), przeciwciała monoklonalne, podwyższone poziomy przeciwciał autoimmunologicznych (czynnik reumatoidalny-RF, przeciwciała przeciwjądrowe-ANA przeciwciała antymitochondrialne-ANA)] oraz próbki uzyskane od kobiet w ciąży, nie interferują z testem Anti-HBs Elisa.

5.11) Parametry jakościowe

5.11.1) Swoistość diagnostyczna

Wyniki z European Performance Evaluation dla DIAsource Anti-HBs Elisa - reaktywność próbek HBV ujemnych "dawca" i "kliniczna".

Próbka ujemna w teście anti-HBs	Liczba próbek	Wynik ujemny
Nieselekcjonowane próbki dawców	400	400
Pacjenci hospitalizowani	134	134
Próbki potencjalnie interferujące	50	49
Razem	584	583

Swoistość diagnostyczna = $583/584 = 99,83\%$

5.11.2) Czułość metody:

Granica wykrywalności określona przy użyciu rozcieńczeń standardów anti-HBs

Czułość metody określono na 3,6 mIU/ml anti-HBs dla testu DIAsource Anti-HBs Elisa korzystając między innymi ze standardu PEI Anti-HBs.

Wartość S/CO dla 10 mIU/ml anti-HBs wynosiła około 1,60. W przypadku badań rutynowych, przydatne i praktyczne może być zwiększenie wartości odcięcia dla wyników dodatnich do 1,6x standard/CO, w celu uzyskania wartości odcięcia około 10 mIU/ml anti-HBs ("miano ochronne").

5.11.3) Test liniowości z próbkami krwi

Liniowość określono z użyciem dwóch dodatnich próbek surowic o wysokich mianach anti-HBs, poprzez rozcieńczanie ich w całym zakresie pomiarowym testu i następnie w pobliżu poziomu odcięcia stosując wąskie przedziały rozcieńczeń.

Test DIAsource Anti-HBs Elisa wykazał liniową charakterystykę w zakresie rozcieńczeń od 3,6 do 240 mIU/ml.

5.11.4) Czułość diagnostyczna

Próbki dodatnie/Próbki stosowane do oceny czułości/Pacjenci z infekcją HBV

5.11.4.1) Osoby zakażone HBV

Próbki dodatnie w teście anti-HBs	Liczba próbek	Wyniki dodatnie
Osoby zakażone naturalnie	125	125
Osoby szczepione przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B	111	111
Razem	235	235

Czułość diagnostyczna = 235/235= 100%

5.11.4.2) Komercyjne panele serokonwersji HBV

Wykorzystano cztery komercyjnie dostępne panele serokonwersji HBV, składające się z kontrolnych próbek pobieranych w odstępach tygodniowych lub miesięcznych, od pacjentów cierpiących na ostre zapalenie wątroby typu B. Test ANTI-HBs ELISA posiadał wyższą czułość niż test referencyjny do wykrywania przeciwciał anti-HBs.

5.11.4.3) Próbki pobierane w okresie obserwacji

Próbki zostały uzyskane od 22 zdrowych osób, szczepionych przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. Testy rozpoczęto od próbek z krwawień, uzyskanych przed oraz w 3 i 6 miesięcy od momentu szczepienia szczepionką przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. Z użyciem testu ANTI-HBs ELISA, serokonwersję anti-HBs wykryto u wszystkich 22 osób w próbkach pobranych w 3 miesiące po szczepieniu. Z drugiej strony, oznaczenie próbek w teście referencyjnym wykrywającym obecność przeciwciał anti-HBs wykazało pojawienie się serokonwersji u 20 osób w 3 miesiące po szczepieniu, natomiast w przypadku pozostałych dwóch osób, serokonwersję zaobserwowano dopiero w próbkach pobranych w 6 miesięcy po szczepieniu. Świadczy to, że test Anti-HBs Elisa charakteryzuje się wyższą czułością niż test referencyjny wykrywający obecność przeciwciał anti-HBs.

5.11.5) Ocena precyzji

5.11.5.1) Dokładność: powtarzalność w obrębie serii i między seriami

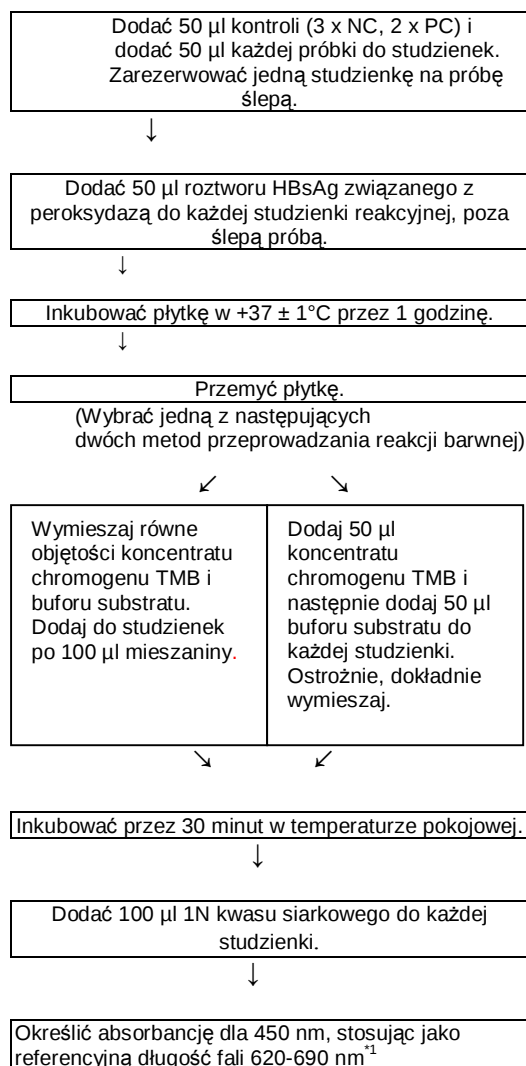
Kontrola dodatnia testu Anti-HBs Elisa (800 mIU/ml) i dwie próbki surowicy o poziomach przeciwciał anti-HBs tuż powyżej wartości odcięcia oraz na średnim poziomie oznaczano 20-krotnie w jednej serii przez trzy dni. Wyniki wykorzystano do wyliczenia powtarzalności w serii i między seriami, co przedstawiają poniższe tabele.

Element testowany		Wielkość próby	Precyzja
Próbka kontrolna dodatnia	w serii	N = 20	CV 10,27%
	między seriami	N = 60	CV 7,11%
Surowica pacjenta #1	w serii	N = 20	CV 7,57%
	między seriami	N = 60	CV 7,17%
Surowica pacjenta #2	w serii	N = 20	CV 9,05%
	między seriami	N = 60	CV 7,71%

5.11.6) Wywód metrologiczny

Kalibrator DAsource anti-HBs Master Calibrator kalibrowano zgodnie ze standardem WHO Anti-HBs-IgG Standard (W1042) z użyciem testu Anti-HBs ELISA. Względny potencjał standardu WHO Anti-HBs Standard w porównaniu z DAsource anti-HBs Master Calibrator wynosi 1,205 (1,117-1,297 95% CI). Stężenie przeciwciał anti-HBs kontroli dodatniej testu Anti-HBs ELISA określono posługując się kalibratorem DAsource anti-HBs Master Calibrator i zostało ono określone na 800 mIU/ml $\pm$ 20%.

5.12) Karta przebiegu procedury testowej



6) UWAGI

*1 Można zastosować referencyjną długość fali fotometru równą 620 nm do 690 nm. Jakkolwiek, użytkownik powinien walidować przed użyciem kombinację fotometru z testem Anti-HBs Elisa.

*2 Niepełna inaktywacja wirusa zapalenia wątroby typu B po inaktywacji termicznej w +60°C przez 10 godzin, J. Infect. Dis. 138:242-244.

7) PIŚMIENNICTWO

1. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Sem Liver Disease. 1991;11:73–83.
2. Lander JJ, Holland PV, Alter HJ, Chanock RM, Purcell RH. Antibody to hepatitis-associated antigen. Frequency and pattern of response as detected by radioimmunoprecipitation. J Am Med Assoc. 1972;220:1079–1082.
3. Deinhardt F, Zuckerman AJ. Immunization against hepatitis B: Report on a WHO meeting on viral hepatitis in Europe; J Med Virology 1985;17:209 – 217.
4. Ambrosch F, Courouge AM, Coursaget P et al. International Group. Immunisation against hepatitis B. Lancet 1988;16: 875-876.
5. Jilg W, Schmidt M, Deinhardt F. Persistence of specific antibodies after hepatitis B vaccination. Hepatol. 1988; 6:201-207.
6. European Consensus Group on Hepatitis B immunity: Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? Lancet. 2000;355:561–565.

Zmodyfikowano : 2011-06-27

	<u>Used symbols</u>
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
	Protect from light

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
UJ	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación

		<u>Stosowane symbole</u>
		Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
		Temperatura przechowywania
		Zużyć przed
LOT		Kod serii
REF		Numer katalogowy
CONTROL		Kontrola
I V D		Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
		Producent
		Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC		Roztwór płuczący stężony
CAL 0		Kalibrator zerowy
CAL N		Kalibrator nr
CONTROL N		Kontrola nr
Ag 125I		Znacznik izotopowy
Ab 125I		Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
		Probówki
INC BUF		Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE		Acetonitryl
SERUM		Surowica
DIL SPE		Rozcieńczalnik próbek
DIL BUF		Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM		Antysurowica
IMMUNOADSORBENT		Immunoabsorbent
DIL CAL		Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN		Roztwór do rozcieńczania
PEG		Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN		Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN		Roztwór elucyjny
GEL		Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN		Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN		Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF		Bufor znacznika
TUT		mikropłytki
Ab HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF		Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC		Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB		Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF		Bufor substratu
STOP SOLN		Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER		Wymagana inkubacja surowicy
BUF		Bufor
Ab AP		Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP		p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC		Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC		Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF		Bufor do oznaczania
Ab BIOT		Koniugatu biotyny
Ab		Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC		Koncentrat streptawidyny HRP
NSB		Wiązanie nieswoiste
2nd Ab		Drugie przeciwciało
ACID BUF		Bufor zakwaszający